

Sinalização Hormonal da Indução da Fotossíntese CAM em Bromélia Epífita C₃-CAM Facultativa Submetida ao Estresse Hídrico

Luciano Freschi¹, Luis Virgílio Gabriel Azevedo², Eduardo Purgatto³ e Helenice Mercier⁴

Introdução

O metabolismo ácido crassuláceo (CAM) é uma adaptação ecofisiológica caracterizada por garantir uma maior eficiência no uso da água pelas plantas [1]. Esse tipo de comportamento fotossintético é particularmente comum entre as espécies epífitas, estando fortemente relacionado às freqüentes oscilações no suprimento hídrico disponível no dossel da floresta [2]. A expressão do CAM pode sofrer variações de intensidade, especialmente nas espécies C₃-CAM facultativas, as quais possuem a capacidade de alternar entre o metabolismo fotossintético C₃ ou CAM dependendo das condições de temperatura, luminosidade e disponibilidade hídrica [3]. Variações hormonais, especialmente nos teores de ácido abscísico (ABA), também parecem estar envolvidas na indução do CAM [3]. De fato, estudos demonstraram que plantas C₃-CAM facultativas submetidas ao estresse hídrico apresentam um aumento pronunciado no conteúdo endógeno de ABA anterior ao início da indução do CAM [3,4]. Adicionalmente, a aplicação de ABA tem se mostrado promotora à mudança da fotossíntese C₃ para CAM mesmo na ausência de estresse hídrico [3,4]. Entretanto, todos esses estudos restringiram-se à espécie C₃-CAM facultativas de hábito terrestre, inexistindo relatos acerca da participação do ABA como um sinal indutor do CAM em espécies epífitas. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo analisar uma possível participação do ABA durante o processo de indução do CAM em resposta ao estresse hídrico na bromélia epífita C₃-CAM facultativa *Guzmania monostachia* (L.).

Material e métodos

A. Material vegetal e condições de cultivo

Plantas de *G. monostachia* foram cultivadas *in vitro* durante cerca de 1 ano em meio de cultura de Knudson [5], sendo posteriormente transferidas para casa de vegetação onde permaneceram por mais 2 anos para completarem seu desenvolvimento. Durante a realização dos experimentos essas plantas foram mantidas sob fotoperíodo de 12 horas, temperatura de 25±2°C e

intensidade luminosa de 300 µmoles.m⁻².s⁻¹.

B. Tratamentos com estresse hídrico

Um lote de plantas de *G. monostachia* foi submetido a uma redução gradual na disponibilidade hídrica, obtida por meio da suspensão na rega (tratamento de estresse hídrico). Paralelamente, plantas de um segundo lote foram regadas diariamente, servindo como controle. Amostras de tecido foliar foram coletadas 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 15 dias após o início dos tratamentos e destinadas às análises bioquímicas.

C. Tratamentos com ABA exógeno

Plantas de um terceiro lote foram tratadas com 10 ou 100 µM de ABA e mantidas durante 15 dias na ausência de estresse hídrico. Após esse período, amostras de tecido foliar foram coletadas e destinadas às análises bioquímicas.

D. Avaliação do tipo de comportamento fotossintético

O tipo de fotossintético (C₃ ou CAM) apresentado pelas plantas de *G. monostachia* foi caracterizado por meio das análises das atividades da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) e malato desidrogenase (MDH) e do acúmulo noturno de acidez titulável e L-malato.

E. Acúmulo noturno de acidez titulável e L-malato

Para a análise da acidez titulável, amostras de 1g de folhas foram maceradas, extraídas em água fervente, filtradas e, em seguida tituladas com 20 mM de NaOH até pH 9.0. Paralelamente, alíquotas retiradas desses mesmos extratos foram analisadas quanto ao teor de L-malato pelo método enzimático conforme descrito por Hohorst [6].

F. Atividade das enzimas PEPC e MDH

Amostras de 1g de folhas foram maceradas, extraídas, dessalinizadas e analisadas quanto à atividade da PEPC conforme Nievola *et. al.* [7]. Esses mesmos extratos enzimáticos também foram ensaiados quanto à atividade da MDH em meio de reação contendo 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM MgCl₂ e 0.2 mM NADH. Em ambos os casos, a reação foi realizada a 30°C e o consumo de NADH foi mensurado em espectrofotômetro a 340 nm.

1. Luciano Freschi é Doutorando do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. Rua do Matão, 277, São Paulo, SP, CEP 05508-970. E-mail: freschi@usp.br

2. Luis Virgílio Gabriel Azevedo é Estagiário do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. Rua do Matão, 277, São Paulo, SP, CEP 05508-970.

3. Eduardo Purgatto é Professor do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Avenida Prof Lineu Prestes 580, Bloco 14, São Paulo, SP, CEP 05508-900.

4. Helenice Mercier é Professora do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. Rua do Matão, 277, São Paulo, SP, CEP 05508-970.

Apoio financeiro: FAPESP (processo 05-54515-5).

G. Determinação do conteúdo relativo de água

O conteúdo relativo de água foi calculado a partir da razão entre a massa fresca e massa seca de amostras de tecido foliar. Para obtenção da massa seca, amostras de 1g foram mantidas em estufa a 60°C por 72 horas.

H. Determinação dos teores endógenos de ABA

Amostras de 1g de tecido foliar foram maceradas, homogeneizadas com 5 mL de metanol 80% e, em seguida mantidas em agitação durante 24 horas a 4°C. Posteriormente, esses extratos foram filtrados, liofilizados, e então, submetidos ao fracionamento por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). As frações correspondentes ao ABA foram coletadas, concentradas a vácuo, e, então, metiladas. As frações metiladas foram analisadas por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa, com monitoramento seletivo de íons (CG-ME-SIM).

Resultados

A. Indução do CAM por estresse hídrico

Como mostrado na Fig. 1A, observou-se uma redução progressiva no conteúdo de água presente nas folhas das plantas a partir do 2º dia de tratamento na condição de estresse hídrico. Por outro lado, o teor de água observado nas folhas das plantas mantidas na condição controle não apresentou variações significativas durante todo o experimento (Fig. 1A).

As plantas mantidas na condição controle apresentaram valores reduzidos tanto de atividade da PEPC (Fig. 1B) e MDH (Fig. 1C) quanto de acúmulo noturno de acidez titulável (Fig. 1D) e L-malato (Fig. 1E). Além disso, nas plantas mantidas como controle todos esses parâmetros permaneceram praticamente inalterados durante os 15 dias de experimento.

Por outro lado, observou-se um aumento progressivo nas atividades das enzimas PEPC e MDH (Figs. 1B e 1C) e no acúmulo noturno de acidez titulável e L-malato (Figs. 1D e 1E) entre o 3º e o 5º dia após a transferência das plantas para a condição de estresse hídrico. Períodos de incubação na presença de estresse hídrico superiores a 5 dias não resultaram em diferenças consideráveis nas atividades da PEPC e MDH e no acúmulo noturno de ácidos (Figs. 1B a 1E).

B. Influência do ABA na indução do CAM

As plantas tratadas com ABA na ausência de estresse hídrico apresentaram um aumento nas atividades da PEPC e MDH (Fig. 2A) e no acúmulo de ácidos orgânicos (Fig. 2B) de maneira dose-dependente. No que concerne às análises hormonais, observou-se um aumento progressivo no conteúdo endógeno de ABA já a partir do 1º dia da transferência das plantas para a condição de estresse hídrico. O teor endógeno de ABA detectado nas plantas mantidas por 15 dias na presença de estresse hídrico foi 534 % superior àquele observado nas plantas mantidas na condição controle (Fig. 1F).

Discussão

Os dados obtidos com as análises das atividades da

PEPC e MDH e acúmulo noturno de ácidos orgânicos corroboram trabalhos anteriores com *G. monostachia* [2], uma vez que demonstraram que plantas mantidas em condições normais de disponibilidade hídrica apresentam fotossíntese do tipo C₃, podendo ser induzidas ao CAM em resposta ao estresse hídrico. Essa mudança de comportamento fotossintético ocorreu de maneira rápida e intensa, iniciando-se já no 3º dia de exposição ao estresse hídrico e atingindo seu potencial máximo a partir do 5º dia nesse tratamento.

Resultados oriundos de duas diferentes abordagens indicaram uma provável participação do ABA durante a indução do CAM por estresse hídrico em *G. monostachia*. Primeiramente, a aplicação de ABA mostrou-se efetiva na indução do CAM nessa epífita mesmo na ausência de estresse hídrico. Em segundo lugar, houve um aumento pronunciado no conteúdo endógeno de ABA durante a exposição ao estresse hídrico, sendo que o início desse aumento (1º dia) precedeu o início da expressão do CAM (3º dia). Tais resultados se assemelham àqueles observados em espécies C₃-CAM facultativas de hábito terrestre [2,3].

Em conclusão, os resultados obtidos permitem inferir a atuação do ABA como um sinal mediador da indução do comportamento CAM causado por estresse hídrico em *G. monostachia*, demonstrando similaridades na sinalização desse evento entre espécies C₃-CAM facultativas terrestres e epífitas.

Agradecimentos

Essa pesquisa foi financiada pela FAPESP.

Referências

- [1] LÜTTGE, U. 2004. Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism (CAM). *Annals of Botany* 93: 629-652.
- [2] MARTIN, CE. 1994. Physiological ecology of the Bromeliaceae. *Botanical Review*, 60: 1-82.
- [3] TAYBI, T & CUSHMAN, JC. 1999. Signaling events leading to crassulacean acid metabolism induction in the common ice plant. *Plant Physiology*, 12: 545-555.
- [4] TAYBI, T, SOTTA, B, GEHRIG, H, GÜCLÜ, S, KLUGE, M, BRULFERT, J. 1995. Differential effects of abscisic acid on phosphoenolpyruvate carboxylase and CAM operation in *Kalanchoe blossfeldiana*. *Botanica Acta*, 198: 240-246.
- [5] KNUDSON, I. (1946) A new nutrient solution for germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin*, 15: 214-217.
- [6] HOHORST, H.J. 1965. L(-)-Malate, Determination with malic dehydrogenase and DPN. In: BERGMAYER, H.U. (Ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*. New York: Academic Press. p.328-332
- [7] NIEVOLA, C.C.; KRAUS, J.E., FRESCHI, L., SOUZA, B.M., MERCIER, H. 2005. Temperature determines the occurrence of CAM or C₃ photosynthesis in pineapple plantlets grown *in vitro*. *In Vitro Cellular and Development Biology – Plant*, 41: 832-837.

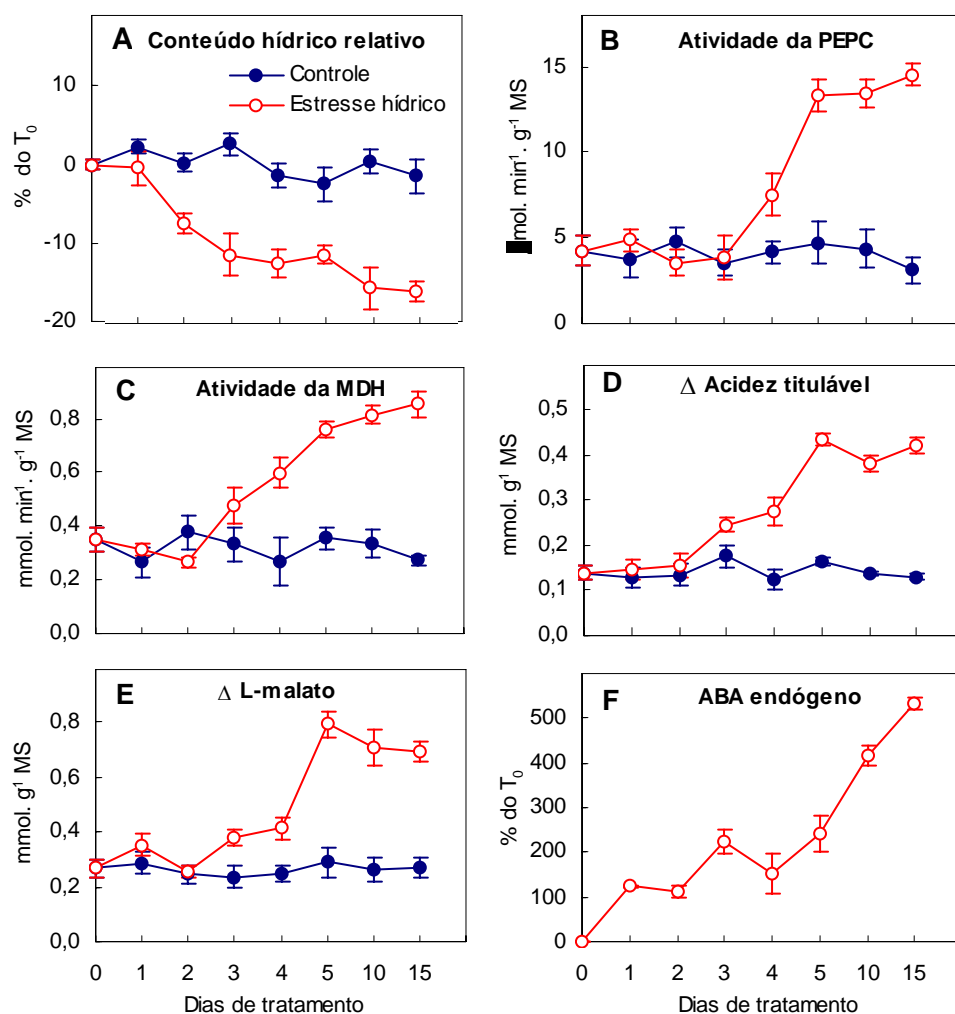


Figura 1. Conteúdo relativo de água em folhas de plantas de *G. monostachia* mantidas na presença ou na ausência de estresse hídrico (Fig. 1A), expresso como porcentagem do observado no tempo 0. Atividade das enzimas PEPC (Fig. 1B) e MDH (Fig. 1C) e acúmulo noturno de acidez titulável (Fig. 1D) e L-malato (Fig. 1E) em plantas mantidas na presença ou ausência de estresse hídrico. Conteúdo endógeno de ABA em folhas de plantas mantidas na condição de estresse hídrico (Fig. 1F), expresso como porcentagem do observado no tempo 0.

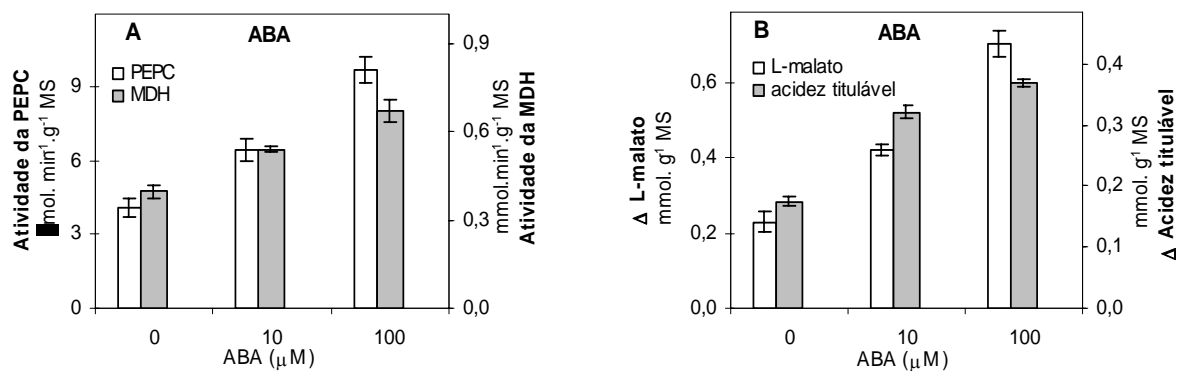


Figura 2. Atividade das enzimas PEPC e MDH (Fig. 2A) e acúmulo noturno de L-malato e acidez titulável (Fig. 2B) em plantas de *G. monostachia* após 15 dias de tratamento com 0, 10 ou 100 μM de ABA na ausência de estresse hídrico.